

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-59142

(P2010-59142A)

(43) 公開日 平成22年3月18日 (2010.3.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 36/48 (2006.01)	A 6 1 K 35/78 J	2 B 1 5 0
A 6 1 K 31/704 (2006.01)	A 6 1 K 31/704	4 B 0 1 8
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	4 C 0 8 6
A 2 3 L 1/30 (2006.01)	A 2 3 L 1/30 B	4 C 0 8 8
A 2 3 K 1/16 (2006.01)	A 2 3 K 1/16 3 O 3 D	
審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 15 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-301874 (P2008-301874)	(71) 出願人	593106918 株式会社ファンケル
(22) 出願日	平成20年11月27日 (2008.11.27)		神奈川県横浜市中区山下町89番地1
(31) 優先権主張番号	特願2008-206168 (P2008-206168)	(74) 代理人	100105061 弁理士 児玉 喜博
(32) 優先日	平成20年8月8日 (2008.8.8)	(74) 代理人	100150681 弁理士 佐藤 荘助
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100122954 弁理士 長谷部 善太郎
		(72) 発明者	土屋 衣里日 神奈川県横浜市戸塚区上品濃12番13号 株式会社ファンケル総合研究所内
		(72) 発明者	松岡 小百合 神奈川県横浜市戸塚区上品濃12番13号 株式会社ファンケル総合研究所内 最終頁に続く

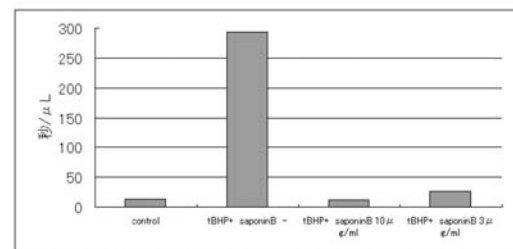
(54) 【発明の名称】 血流改善組成物

(57) 【要約】

【課題】 血流改善剤を提供する。

【解決手段】 大豆サポニン B グループを主要成分とする血流改善組成物。

【選択図】 図 3



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

大豆サポニンBグループを含有する血流改善組成物。

【請求項 2】

大豆サポニンBグループは大豆抽出物由来であって、大豆抽出物100重量部のうち、大豆サポニンBグループを30～100重量部含有する大豆抽出物であることを特徴とする請求項1記載の血流改善組成物。

【請求項 3】

大豆サポニンBグループは大豆抽出物由来であって、大豆抽出物100重量部のうち、大豆サポニンBグループを50～100重量部含有する大豆抽出物であることを特徴とする請求項1記載の血流改善組成物。

10

【請求項 4】

大豆サポニンBグループ含有物には、大豆サポニンBグループとしてSoyasaponinI、II、III、IV、Vあるいはそれらのアセチル体、大豆サポニンAグループとしてSoyasaponin A1、A2、A3、A4、A5、A6、Ac、Adあるいはそれらのアセチル体が含まれていることを特徴とする請求項1～3に記載の血流改善組成物。

【請求項 5】

請求項1～4のいずれかに記載の血流改善組成物を含有する血流改善食品。

【請求項 6】

請求項1～4のいずれかに記載の血流改善組成物を含有する血流改善飼料又は動物薬。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血流改善剤に関する。

【背景技術】

【0002】

本出願人は、大豆成分の特性に着目して研究開発を続けてきた。先に、大豆サポニンBグループに異常タンパク質除去作用があることを知見し、特許文献1（特開2006-124327号公報）を提案した。

30

本出願人は更に、研究開発を継続しており、大豆サポニンBグループに血流改善機能があることを知見することができた。

【0003】

【特許文献1】特開2006-124327号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、血流改善剤を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

40

(1) 大豆サポニンBグループを含有する血流改善組成物。

(2) 大豆サポニンBグループは、大豆抽出物由来であって、大豆抽出物100重量部のうち、大豆サポニンBグループを30～100重量部含有する大豆抽出物であることを特徴とする(1)記載の血流改善組成物。

(3) 大豆サポニンBグループは、大豆抽出物由来であって、大豆抽出物100重量部のうち、大豆サポニンBグループを50～100重量部含有する大豆抽出物であることを特徴とする(1)記載の血流改善組成物。

(4) 大豆サポニンBグループ含有物には、大豆サポニンBグループとしてSoyasaponinI、II、III、IV、Vあるいはそれらのアセチル体、大豆サポニンAグループとしてSoyasaponin A1、A2、A3、A4、A5、A6、Ac、Adあるいはそれらのアセチル体が含まれていることを特

50

徴とする(1)～(3)に記載の血流改善組成物。

(5)(1)～(4)のいずれかに記載の血流改善組成物を含有する血流改善食品。

(6)(1)～(4)のいずれかに記載の血流改善組成物を含有する血流改善飼料又は動物薬。

【発明の効果】

【0006】

大豆サポニンBグループ高含有組成物には血流改善効果がある。特に、大豆サポニンBグループ高含有組成物には、老化や酸化ストレスにより低下した血流速度を改善し、血液をさらさらにすることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

10

【0007】

以下に、本発明を詳細に説明する。

血液の流動性が低下し、どろどろとなった場合に、新陳代謝の弊害、末梢血管の閉塞、脳梗塞など危険性が高くなる。老廃物が皮膚組織等に滞留すると、皮膚状態も劣化する。皮膚状態が不良であるときは、化粧のりも悪化する。血液の流動性を維持、向上、改善することは、健康状態を保持する基礎条件のひとつである。

本発明は、ストレス負荷によって、血流が低下した状態において大豆サポニンBグループを高濃度とした組成物が、血流を改善することを確認した。

【0008】

大豆由来のサポニンは、大豆種子中の種皮、子葉、胚軸又は大豆植物体の葉、茎、根等に広く分布する。構造的にはグリチルリチンと類似の構造であるが、トリテルペノイド骨格に2～5個の糖から成る糖鎖を持つ。大豆サポニンはアグリコン(非糖部)の構造によって4つのグループ(A、B、E及びDDMPグループ)に分類され、すべてのグループのサポニンが多種多様な糖鎖構造を有する。

20

現在までにSoyasapogenol A、B、E及びDDMPをそれぞれアグリコンとする8種類のAグループ、2種類のEグループ、5種類のBグループ、6種類のDDMPグループが同定されている。

サポニンAグループはSoyasapogenol AのC-3とC-22位の2箇所に糖鎖が結合したビスデスモサイド型サポニンで大豆の種子胚軸にのみ分布しており不快味(苦み、収斂味)の主因である。現在サポニンAグループに関しては2通りの命名があり、SoyasaponinA1とSoyasaponinAbは同一化合物であり、同じくA2はAf、A3はAh、A4はAa、A5はAe、A6はAgとなっている。Ac及びAdは別名が知られていない。

30

【0009】

これに対してサポニンBグループ及びEグループは、C-3位にのみ糖鎖が1本結合したモノデスモサイド型サポニンである。サポニンDDMPグループは温和な条件下で抽出を行なうと精製できるが(非特許文献Agric Biol Chem,57 546-550(1993))、加熱条件下及びアルカリ条件下においてサポニンBグループに変換される。従って大豆中に存在するサポニンはそのほとんどがサポニンAグループ及びサポニンDDMPグループであって、サポニンBグループはわずかであり、サポニンBグループはその多くが抽出の際にサポニンDDMPグループから生成するアーティファクト成分であると推定されている。サポニンBグループは大豆胚軸や子葉に多く存在し、現在サポニンBグループに関しては2通りの命名があり、SoyasaponinIとSoyasaponinBbは同一化合物であり、同じくIIはBc、IIIはBb'、IVはBc'、VはBaとなっている(非特許文献BBB 62(12) 2291-2299,1998)。

40

【0010】

一般に、サポニンは溶血性を示すものが多い。しかし、大豆サポニンは溶血性をほとんど有さないという報告がなされている(非特許文献基礎と臨床 Vol.15 No.5 1981)。また、本発明者等が大豆から得られた大豆サポニン類の家兎2%血液浮遊液に対する溶血指数を測定したところ、人参サポニンと同様100以下であり、他の報告同様溶血性を有さないことが判明した。

また、本発明者等は、特許文献1に開示したように、変異原性及び急性毒性について試

50

験したところ、いずれも異常なく、大豆サポニンBグループは安全性が高いことが確認された。

本発明の高含有大豆サポニンBグループは、以下の工程で得ることが出来る。

【0011】

[サポニンの抽出]

原料大豆胚軸は、有機溶媒等であらかじめ脱脂したもの、していないものいずれも使用可能であるが、サポニンの抽出効率から脱脂したものの方が有利である。原料大豆胚軸よりサポニンを抽出する方法は、室温から80℃において原料に対して5～10倍容量の抽出溶媒を加えて攪拌するのが一般的な方法であるが、サポニンが十分に抽出できる条件であれば特に限定されない。

10

本発明におけるイオン交換樹脂は、3級アミンを含む弱塩基性陰イオン交換樹脂であれば特に制限はなく、粒径が不均一な樹脂、例えば、三菱化成製ダイヤイオンWA-30なども利用可能であるが、平均粒径±10%の範囲に90%以上の粒度分布をもつ均一粒径のものが好ましい。

【0012】

[サポニンの溶出・精製]

上記サポニン抽出液から、蒸留操作により溶媒を溜去し、水で希釈したサポニン溶液を上記イオン交換樹脂に吸着させた後、水、アルコールあるいは含水アルコールで樹脂を洗浄した後、酸又はアルカリを使って樹脂に吸着させたサポニンを溶出する。溶出したサポニン溶液をそのまま乾燥して得られる大豆サポニン粗精製物は純度20～50重量%と低く、サポニン以外の不純物が多く、生理活性の高い大豆サポニンBグループの比率も20～30重量%程度と低いものである。

20

【0013】

サポニンの純度を高めるために、溶出したサポニンをそのまま水で希釈し、無極性の合成吸着剤にサポニンを吸着させる。無極性の合成吸着剤としては、スチレン・ジビニルベンゼン型樹脂などがあり、例えば、三菱化学製、ダイヤイオンHP-20やローム・アンド・ハース社製のアンバーライトXAD-2などが使用可能である。合成吸着剤に吸着させる際に使用する含水アルコール中のアルコール濃度はアルコールの種類によって異なるが、メタノールの場合は、0～50重量%、エタノールの場合は、0～30重量%が好ましい。次に、水あるいは含水エタノールで樹脂を洗浄した後、洗浄時よりアルコール濃度の高い含水アルコールで溶出させてサポニン高含有溶液を得ることができる。

30

【0014】

[後処理]

得られたサポニン高含有溶液を、必要に応じてpH調製剤を用いてpH調製した後、加熱乾燥、減圧加熱乾燥、スプレードライ、凍結乾燥などの方法で乾燥することにより高含有大豆サポニン粉末を得ることができる。

以上の工程で効率よく安価に、純度70重量%以上の高含有大豆サポニンを得ることができ、かつ、活性の高い大豆サポニンBグループを50%重量以上の濃度に濃縮できる他、総サポニン中の大豆サポニンBグループ比率を70重量%以上に高めることもできる。

例えば、特開2006-124324号公報に製法が開示されている。

40

【0015】

樹脂による精製を行なう順序としては、陰イオン交換樹脂による処理を行なった後に、無極性の合成吸着剤による精製を行なう。合成吸着剤で先に処理した場合、低極性物質などが合成吸着剤に強く吸着され、アルカリ処理など、通常の樹脂再生処理を行なっても樹脂の劣化が起こり、樹脂の能力が徐々に低下するが、これに対して、先に陰イオン交換樹脂で大豆サポニンを粗精製することにより、大豆イソフラボンやオリゴ糖の他、低極性物質を取り除くことができ、続く無極性の合成吸着剤の処理能力が向上し、劣化が起こり難くなるのである。その際には、陰イオン交換樹脂は、アルカリによる処理により何度も繰り返し使うことができる。

【0016】

50

大豆サポニンBグループをリッチに調製した組成物には、血流改善効果があることが確認できた。

このような作用効果を利用する形態としては、医薬、食品、飲料、サプリメント、食品添加剤、飼料、飼料添加剤、動物薬等である。経口提供、非経口提供も可能である。

高含有大豆サポニンBグループは、そのままでも、様々な用途に使用できるが、目的に応じて予め様々な他の成分と混合、あるいは食品や飼料あるいは動物薬に添加することができる。

【0017】

食品としては、直接、又は種々の栄養成分を添加して使用できる。例えば、澱粉、乳糖、麦芽糖、植物油粉末、カカオ脂末、ステアリン酸などの適当な助剤を添加した後、慣用の手段を用いて、食用に適した形態、例えば、顆粒状、粒状、錠剤、カプセル、ペーストなどに成形して健康補助食品、保健機能食品などとして、食用に供してもよく、また種々の食品、例えば、ハム、ソーセージなどの食肉加工食品、かまぼこ、ちくわなどの水産加工食品、パン、菓子、バター、粉乳、発酵乳製品に添加して使用してもよく、水、果汁、牛乳、清涼飲料などの飲料に添加して使用してもよい。そのような剤、食品は、通常採用されている製剤化技術により製造することができる。

10

【0018】

医薬としての適用方法は、経口投与又は非経口投与のいずれも採用することができる。投与に際しては、有効成分を経口投与、直腸内投与、注射などの投与方法に適した固体又は液体の医薬用無毒性担体と混合して、慣用の医薬製剤の形態で投与することができる。

20

【0019】

増量剤と混合した組成物の状態としておくことと便利に使用できる。増量剤としては、グルコース、ラクトース、マルトース、ショ糖等の糖類、ソルビトール等の糖アルコール、デキストリン、サイクロデキストリン等の加工澱粉、小麦澱粉、コーンスターチ等の澱粉類、カゼイン、大豆蛋白質等の蛋白質、アラビアガム、アルギン酸ナトリウム、カゼインナトリウム、ゼラチン、ペクチン、粉末セルロース、カルボキシメチルセルロース等の高分子安定剤、レシチン、ショ糖脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル等の乳化剤、カルシウム粉末等が使用できる。

【0020】

本発明の血流改善組成物は、上記高含有大豆サポニンBグループの他に抗酸化作用を有する化合物を含有させることができる。抗酸化作用を示す化合物は、特に限定されるものではないが、例えば各種ビタミン類、シマリリン等の各種ポリフェノール類、トコトリエノール、補酵素Q10及びそれらを含有する天然成分などが挙げられる。

30

【0021】

本発明の組成物は、例えば水溶液、油剤、乳液、懸濁液等の液剤、ゲル、クリーム等の半固形剤、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤等の固形剤の形態で適用可能である。従来から公知の方法でこれらの形態に調製し、種々の剤型とすることができる。

【0022】

本発明の血流改善組成物は、高含有大豆サポニンBグループを主要有効成分として含有する他に、必要に応じ薬学的に許容される希釈剤又は担体等の添加剤を含有することができる。また、本発明の組成物は、必要により、薬学的に活性の高い他の薬効成分を含有することができる。

40

【0023】

その他、用途や剤型に応じて次のようなものを添加することができる。

油脂類としては、例えば、ツバキ油、月見草油、マカデミアナッツ油、オリーブ油、ナタネ油、トウモロコシ油、ゴマ油、ホホバ油、胚芽油、小麦胚芽油、米油、トリオクタ酸グリセリン、等の液体油脂、カカオ脂、ヤシ油、硬化ヤシ油、パーム油、パーム核油、モクロウ、モクロウ核油、硬化油、硬化ヒマシ油等の固体油脂、ミツロウ、キャンデリラロウ、綿ロウ、ヌカロウ、ラノリン、酢酸ラノリン、液状ラノリン、サトウキビロウ等のロウ類が挙げられる。

50

【 0 0 2 4 】

増粘剤として、例えば、カラギーナン、トラガカントガム、クインスシード、カゼイン、デキストリン、ゼラチン、CMC、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシビニルポリマー、グアーガム、キサンタンガム、ベントナイト等を挙げることができる。

【 0 0 2 5 】

薬効成分としては、例えば、ビタミンA油、レチノール等のビタミンA類、リボフラビン等のビタミンB₂類、ピリドキシン塩酸塩等のビタミンB₆類、ビタミンB₁₂、葉酸、L-アスコルビン酸、L-アスコルビン酸リン酸エステル、L-アスコルビン酸モノパルミチン酸エステル、L-アスコルビン酸ジパルミチン酸エステル、L-アスコルビン酸 - 2 - グルコシド等のビタミンC類、パントテン酸カルシウム等のパントテン酸類、ビタミンD₂、コレカルシフェロール等のビタミンD類； α -トコフェロール、酢酸トコフェロール、ニコチン酸、 α -トコフェロール等のビタミンE類等のビタミン類を挙げることができる。

10

【 0 0 2 6 】

プラセンタエキス、グルタチオン、ユキノシタ抽出物等の美白剤、ローヤルゼリー、ブナノキエキス等の皮膚賦活剤、カプサイシン、ジンゲロン、カンタリスチンキ、イクタモール、カフェイン、タンニン酸、 γ -オリザノール等の血行促進剤、グリチルリチン酸誘導体、グリチルレチン酸誘導体、アズレン等の消炎剤、アルギニン、セリン、ロイシン、トリプトファン等のアミノ酸類、常在菌コントロール剤のマルトースショ糖縮合物、塩化リゾチーム等を挙げることができる。

20

【 0 0 2 7 】

さらに、カミツレエキス、パセリエクス、ブナノキエキス、ワイン酵母エキス、グレープフルーツエキス、スイカズラエキス、コメエキス、ブドウエキス、ホップエキス、コメヌカエキス、ビワエキス、オウバクエキス、ヨクイニンエキス、センブリエキス、メリロートエキス、バーチエキス、カンゾウエキス、シャクヤクエキス、サボンソウエキス、ヘチマエキス、トウガラシエキス、レモンエキス、ゲンチアナエキス、シソエキス、アロエエキス、ローズマリーエキス、セージエキス、タイムエキス、茶エキス、海藻エキス、キューカンバーエキス、チョウジエキス、ニンジンエキス、マロニエエキス、ハママリスエキス、クワエキス等の各種抽出物を挙げることができる。

30

【 0 0 2 8 】

以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例等に限定されるものではない。

【 実施例 1 】

【 0 0 2 9 】

健常な36歳男性から血液を採取し、モノ・ポリ分離液を用いて赤血球を分離し、培養した。培養赤血球にH₂O₂を最終濃度で0、0.01、0.03、0.1、0.3、1および3mMになるように処理し、24時間培養した。その結果、H₂O₂を1mMで処理することにより、赤血球の通過時間が遅延することを確認し、このストレス負荷による遅延した赤血球の通過時間の改善試験を行った。

40

< MC-FAN >

血流速度は汎用されている血液流動性検査装置「MC FAN (マイクロチャネルアレイ) 」(株) 日立原町電子工業)で測定した。

「MC FAN」は、マイクロチャネルアレイ(等間隔で配列されたマイクロチャネルを搭載したシリコンチップ)に採血した血液を流すことで、血液の流動性を確認することができる検査装置である。マイクロチャネルの幅(6 ~ 7 μ m)を末梢の毛細血管の太さと同等にすることで、擬似的に末梢毛細血管を再現し、高ストレス状態における血液流動性を確認できる。血流速度は赤血球通過時間で表し、通過時間が遅いほど血流が遅い、通過時間が早いほど血流が速いと判断できる。赤血球通過時間は直前に測定した生理食塩水100 μ lの通過時間で補正することが必要である。例えば、生理食塩水通過時間の基準値を12秒と

50

すれば、次式 (血液通過時間) × 12秒 / (生理食塩水通過時間) により補正值が得られる。

シリコンチップはBloody6-7 (流路本数8736本、平均流路幅 7 μ m、流路長30 μ m) を用い、赤血球懸濁液100 μ l がマイクロチャネルアレイを通過する時間を測定した。

【 0 0 3 0 】

< 試験材料および方法 >

1. 赤血球分離溶液, 赤血球および培地、被験物質の調製

・ 赤血球分離溶液; モノ・ポリ分離溶液, 大日本製薬 __ C a t . N o . 1 6 9 8 0 - 4 9 D N __ L o t . N o . F 0 5 0 1 7 - 1 0 0

・ 赤血球; 健常な36歳男性から血液を採取し、モノ・ポリ分離溶液を用いて赤血球を分離した。

・ 赤血球用培地; 基礎培地 (R P M I 1 6 4 0) を使用した。

・ 大豆サポニン は生化学用試薬グレードのジメチルスルホキシド (D M S O ; 和光純薬) により溶解したストック溶液 (10 m g / m l) を調製し、培養液に適当量添加し、0.2 μ m のフィルターを用いてろ過滅菌後、細胞に処理した。

2. 試験例

試験に用いた試料の大豆サポニンAと大豆サポニンBの配合比率を表 1 に示す。

【 0 0 3 1 】

【表 1】

成分	試料 (1)	試料 (2)	試料 (3)	試料 (4)
大豆サポニンA	16%	32%	5%	20%
大豆サポニンB	35%	24%	54%	54%

20

【 0 0 3 2 】

3. 酸化ストレス負荷および大豆サポニン処理したヒト培養赤血球通過時間測定法

(a) 抗凝固剤としてヘパリンフィルムを含む採血管に血液 5 m l を採血した。

(b) クリーンベンチ内で、滅菌済みの15m l プラスチックチューブにモノ・ポリ分離溶液 (以下 M - P R M と略す; 大日本製薬, C a t . N o . 1 6 - 9 8 0 - 4 9) を 3 m l 加える。

(c) ヒト全血3.5m l を M - P R M の上に静かに重層する。

(d) 室温でスイング式の遠心分離機で1900rpm × 20分間遠心する。

(e) パスツールピペットで赤血球以外の層を除去する。

(f) 培地 (R P M I 1 6 4 0) を10m l 加え、軽く攪拌後、室温でスイング式の遠心分離機で1500rpm × 10分間遠心する。

(g) 上清を除去し、培地 (R P M I 1 6 4 0) を加えて攪拌後、浮遊細胞用 d i s h に細胞を播種し、H₂O₂ および試料(1) ~ (4) を下記の表 2 の通り処理し、37 °C、5 % C O₂ インキュベータ内で 2 4 時間インキュベートする。

【 0 0 3 3 】

40

【表 2】

Sample No.	H2O2 (1mM)	SP (10 μ g/ml)
1	-	-
2	+	-
3	-	(1) or (2)
4	+	(1) or (2)
5	-	(3) or (4)
6	+	(3) or (4)

10

【0034】

(i) 15ml プラスチックチューブに各細胞を回収し、コールターカウンター（細胞数測定装置）で細胞数を測定する。

(j) 室温でスイング式の遠心分離機で1500rpm×10分間遠心後上清を除去し、 1.5×10^7 cells / 300 μ l になるように培地（RPMI 1640）を加えて細胞を再浮遊させる。

20

(k) MC-FANのマニュアルに従い、各サンプルの赤血球通過時間を測定する。

【0035】

<酸化ストレス負荷した赤血球の通過時間の遅延と大豆サポニン処理による赤血球通過時間の遅延抑制作用の評価>

表3、図1に過酸化水素処理と大豆サポニン試料(1)、(3)処理の有無による、赤血球通過時間を示す。過酸化水素処理しない場合は、大豆サポニン添加による影響は観察されない。これに対して、過酸化水素処理して、ストレス負荷した場合には、赤血球通過時間が遅延するが、大豆サポニンを添加した試料(1)(3)共に赤血球通過時間の遅延が抑えられ、試料(3)の方が遅延抑制作用が大きいことが分かる。

【0036】

30

【表 3】

サンプル	補正後 (秒/ μ L)	H ₂ O ₂ (mM)	赤血球数 ($\times 10^7$ cell/300 μ l)
control	21.41	-	1.5
H ₂ O ₂ - saponin(1)	21.48	-	1.5
H ₂ O ₂ - saponin(3)	21.46	-	1.5
H ₂ O ₂ + saponin-	25.55	1	1.5
H ₂ O ₂ + saponin(1)	23.85	1	1.5
H ₂ O ₂ + saponin(3)	22.76	1	1.5

40

【0037】

表4、図2に過酸化水素処理と大豆サポニン試料(2)、(4)処理の有無による、血流速度の測定結果に示す。過酸化水素処理しない場合は、大豆サポニン添加による影響は観察されない。これに対して、過酸化水素処理して、ストレス負荷した場合には、赤血球通過時間が遅延するが、大豆サポニンを添加した試料(2)(4)共に赤血球通過時間の遅延が抑えられ、試料(4)の方が遅延抑制作用が大きいことが分かる。

50

【 0 0 3 8 】

【表 4】

サンプル	補正後 (秒/ μ L)	H ₂ O ₂ (mM)	赤血球数 ($\times 10^7$ cell/ 300μ l)
control	17.24	-	1.5
H ₂ O ₂ - saponin(2)	17.79	-	1.5
H ₂ O ₂ - saponin(4)	17.79	-	1.5
H ₂ O ₂ + saponin-	23.64	1	1.5
H ₂ O ₂ + saponin(2)	22.93	1	1.5
H ₂ O ₂ + saponin(4)	19.62	1	1.5

10

【 0 0 3 9 】

表 3、4、図 1、2 に示される結果から、試料は、(3) = (4) > (1) > (2) の順で、H₂O₂ 処理により遅延した赤血球通過時間が改善されることが明らかになった。試料(3)及び試料(4)は、大豆サポニン B を高濃度配合試料であり、酸化ストレス負荷により低下した血流が大豆サポニン B の濃度依存的に改善されることが明らかになった。

20

【実施例 2】

【 0 0 4 0 】

[高純度大豆サポニン B グループによる血流改善試験]

酸化ストレスを負荷した状態の赤血球に 90% 以上大豆サポニン B グループを含む大豆サポニン試料を添加することにより赤血球通過時間が改善することを確認する試験を行った。試験手法は、基本的には実施例 1 と同様である。酸化ストレス負荷剤として、t-ブチルヒドロペルオキシド (tBHP) を用い、大豆サポニン試料として、サポニン B グループ 91.4% 含有試料を用いた点が主な相違点である。

【 0 0 4 1 】

試験条件を以下に示し、試験結果を表 5、図 3 に示す。

30

試験材料および方法

1. 赤血球分離溶液，赤血球および培地、被験物質の調製

- ・赤血球分離溶液；モノ・ポリ分離溶液，大日本製薬__Cat. No. 16980 - 49DN__Lot. No. F05017 - 100

- ・赤血球；健常な 47 歳男性から血液を採取し、モノ・ポリ分離溶液を用いて赤血球を分離した。

- ・赤血球用培地；基礎培地 (RPMI 1640) を使用した。

- ・大豆サポニン B はサポニン B グループ 91.4% 含有組成物 (J-オイルミルズ社提供) を用い、生化学用試薬グレードのエタノール (和光純薬) により溶解した溶液 (10 mg / ml) を調製し、超音波破碎で完全溶解後、細胞に処理した。

40

2. 酸化ストレス負荷および大豆サポニン処理したヒト培養赤血球通過時間測定法

(a) 抗凝固剤としてヘパリンフィルムを含む採血管に血液 5 ml を採血した。

(b) クリーンベンチ内で、滅菌済みの 15 ml プラスチックチューブにモノ・ポリ分離溶液 (以下 M - PRM と略す；大日本製薬，Cat. No. 16 - 980 - 49) を 3 ml 加える。

(c) ヒト全血 3.5 ml を M - PRM の上に静かに重層する。

(d) 室温でスイング式の遠心分離機で 1900 rpm $\times$ 20 分間遠心する。

(e) パスツールピペットで赤血球以外の層を除去する。

(g) 培地 (RPMI 1640) を 10 ml 加え、軽く攪拌後、室温でスイング式の遠心分離機で 1500 rpm $\times$ 10 分間遠心する。

50

(h)上清を除去し、培地 (R P M I 1 6 4 0) を加えて撹拌後、浮遊細胞用 d i s h に細胞を播種し、各 d i s h に以下の通り大豆サポニンB溶液を添加し、37 、 5 % C O ₂ インキュベータ内で24時間インキュベートする。試験例 A ~ D とする。

A: 添加なし (無処理用)

B: 添加なし (酸化処理用)

C: 大豆サポニン溶液 最終濃度 : 10 μ g / m l

D: 大豆サポニン溶液 最終濃度 : 3 μ g / m l

(i)15m l プラスチックチューブに各細胞を回収し、遠心 (1500 r p m × 5 分) 後、上清を取り除き、培地を添加する。→上記操作を 3 回繰り返す。

(j)浮遊細胞用 d i s h に細胞を播種し、tBHP (t - ブチルヒドロペルオキシド) を 0.25 m M となるよう処理し、37 、 5 % C O ₂ インキュベータ内で30分インキュベートする。

(k)コーンターカウンター (細胞数測定装置) で細胞数を測定する。

(l)室温でスイング式の遠心分離機で1500 r p m × 10分間遠心後上清を除去し、0.125 × 1 0 ⁸ c e l l s / m l になるように培地 (R P M I 1 6 4 0) を加えて細胞を再浮遊させる。

(m)M C - F A N のマニュアルに従い、各サンプルの赤血球通過時間を測定する。

【 0 0 4 2 】

【表 5 】

サンプル	補正後 (秒/μ L)	t BHP (mM)	赤血球数 (×10 ⁸ cell/ml)
(A) control	13.3	-	0.125
(B) tBHP+ saponinB -	293.7	0.25	0.125
(C) tBHP+ saponinB 10μ g/ml	12.4	0.25	0.125
(D) tBHP+ saponinB 3μ g/ml	27.1	0.25	0.125

【 0 0 4 3 】

この結果、ほぼピュアな大豆サポニン B を 10 μ g / m l あるいは 3 μ g / m l 濃度とした試験料 C、D において酸化ストレスを与えていないコントロールと同程度までに赤血球通過時間が改善されることが確認できた。

すなわち、tBHPによる酸化ストレスを負荷すると赤血球通過時間は、20倍以上遅延するが、このストレス状態に大豆サポニン B 10 μ g / m l 濃度とした試験例 C では、コントロールとほぼ同程度に、大豆サポニン B 3 μ g / m l 濃度とした試験例 D では、コントロールの 2 倍程度に赤血球通過時間の遅延が抑えられ、酸化ストレス負荷状態よりは10分の 1 以下に改善されている。

以上により、大豆サポニン B グループを高濃度に配合した組成物は、血液をさらさらにする効果が認められる。

【実施例 3 】

【 0 0 4 4 】

< 赤血球変形能測定試験 >

健常者の血液を採取し赤血球を分離後、AAPH処理により酸化ストレスを負荷することで、赤血球変形能が低下する。赤血球変形能の低下は血流速度低下を引き起こす。この試験系を用いて高純度大豆サポニンBグループの赤血球変形能に対する作用を確認した。

【 0 0 4 5 】

健常な32歳女性から血液を採取し、H E P E S Bufferで洗浄赤血球を作製し、6.0% 赤血球懸濁液となるようにヘマトクリット (Hct) を指標に調製した (コントロール試験例) 。調製赤血球を37 60分事前培養した後、AAPH (2 , 2 ' - アゾビス (2 - メチルプロピオンアミジン) 二塩酸塩) を最終濃度で500m M になるように添加し、37 60分培養

した（AAPH負荷処理試験例）。

酸化ストレスを惹起した調製赤血球培養液に、最終濃度 $10\mu\text{g/ml}$ になるようにHEPES Bufferで調製した大豆サポニンBグループを添加し赤血球変形能の改善試験を行った（AAPH+大豆サポニンBグループ試験例）。

3つの試験例の組成を表6に示す。

【0046】

<赤血球変形能測定方法>

垂直に立てたガラス管（vertical tube）にタイゴンチューブを介してニッケルメッシュホルダーを接続し、通常15cmの高さ（height:h）より赤血球浮遊液を濾過させる。ガラス管の周囲は恒温水を還流させて、検体を定温（25℃）に保つ。ガラス管のゼロレベルに設置した圧力（pressure:P）トランスデューサーで検体を濾過中の圧力降下を連続的に検出し、これを増幅器とAD変換器を介してパソコンに取り込み、流量（flow rate:Q）を計算する。流量は圧力を高さに変換し（ $P=\rho gh$ ）、高さ-時間（h-t）曲線の微分値（ dh/dt ）を取って、これにガラス管の断面積（a）を乗じて得られる（ $Q=dh/dt \cdot a$ ）。コントロールのニュートン流体であるHEPES添加生理食塩水と、赤血球浮遊液の二つの圧-流量曲線において、一定圧（通常100mm・H₂O）でのコントロール液に対する赤血球浮遊液の流量（%）をもって赤血球変形能の指標とする。表6に示す3つの試験例の試験結果を図4に示す。

10

【0047】

【表6】

20

試験例	組 成				備考
	6.0%赤血球懸濁液	5mM HEPES添加生理食塩水	500mM AAPH	1mg/ml大豆サポニンBグループ	
	(ml)	(ml)	(ml)	(ml)	
コントロール	3	2.94	-	0.06	
AAPH負荷処理例	3	2.4	0.6	-	
AAPH+大豆サポニンBグループ	3	2.34	0.6	0.06	大豆サポニンBグループ 最終濃度： $10\mu\text{g/ml}$

30

【0048】

<結果>

この結果、AAPHを添加して酸化負荷処理を施した場合は、コントロールに対して60%以下に低下するが、このAAPH酸化負荷処理に更に大豆サポニンBを添加処理するとコントロールに対して80%にまで回復することを示している。この結果ほぼピュアな大豆サポニンBを $10\mu\text{g/ml}$ 濃度とした試料において赤血球変形能の低下が抑制されることが確認できた。

40

【0049】

処方例1

[カプセル剤]

組成

大豆サポニン（大豆サポニンB 50%含有） ... 50mg

ミツロウ ... 10mg

ぶどう種子オイル ... 110mg

上記成分を混合し、ゼラチン及びグリセリンを混合したカプセル基剤中に充填し、軟カプ

50

セルを得た。

【 0 0 5 0 】

処方例 2

[錠剤]

組成

大豆サポニン（大豆サポニンB 50%含有）	... 1 0 0 m g
セルロース	... 1 0 0 m g
デンプン	... 4 2 . 5 m g
シヨ糖脂肪酸エステル	... 7 . 5 m g

上記成分を混合、打錠し、錠剤を得た。

10

【 0 0 5 1 】

処方例 3

〔ハードカプセル〕

（組 成）（配合）

大豆サポニン（大豆サポニンB 50%含有）	... 1 0 0 m g
セルロース	... 4 0 m g
デンプン	... 5 8 m g
シヨ糖脂肪酸エステル	... 2 m g

上記成分を混合し、プルランをカプセル基材とするカプセルに充填し、ハードカプセルを得た。

20

【図面の簡単な説明】

【 0 0 5 2 】

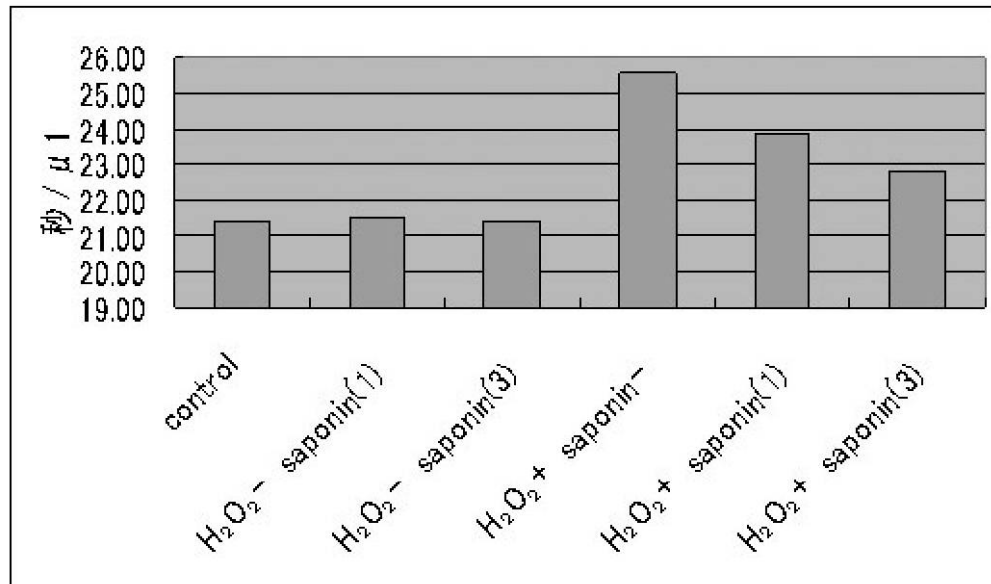
【図 1】試料（1）、（3）に関する血流改善状況を示すグラフ

【図 2】試料（2）、（4）に関する血流改善状況を示すグラフ

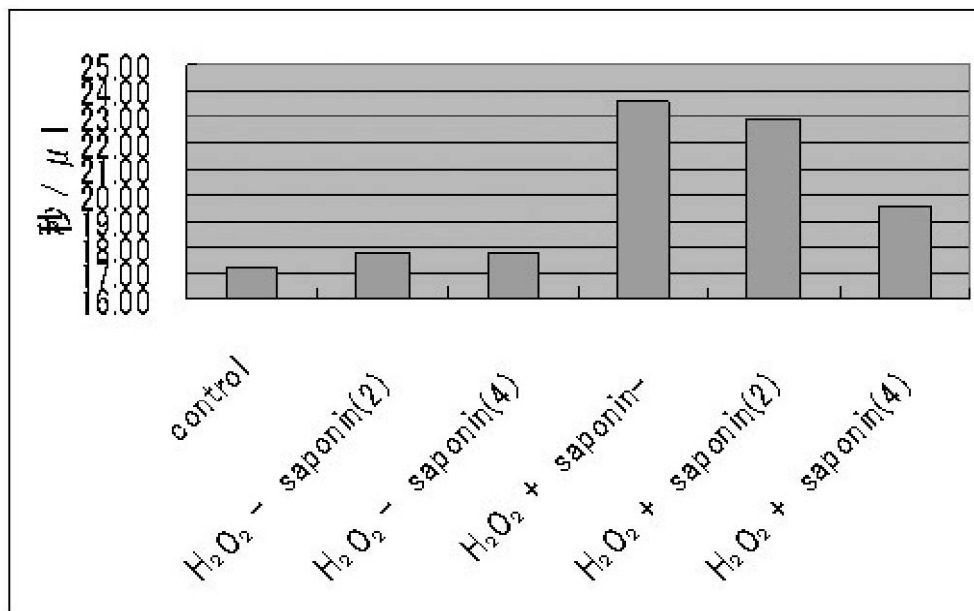
【図 3】実施例 2 に関する血流改善状況を示すグラフ

【図 4】実施例 3 に関する赤血球変形改善状況を示すグラフ

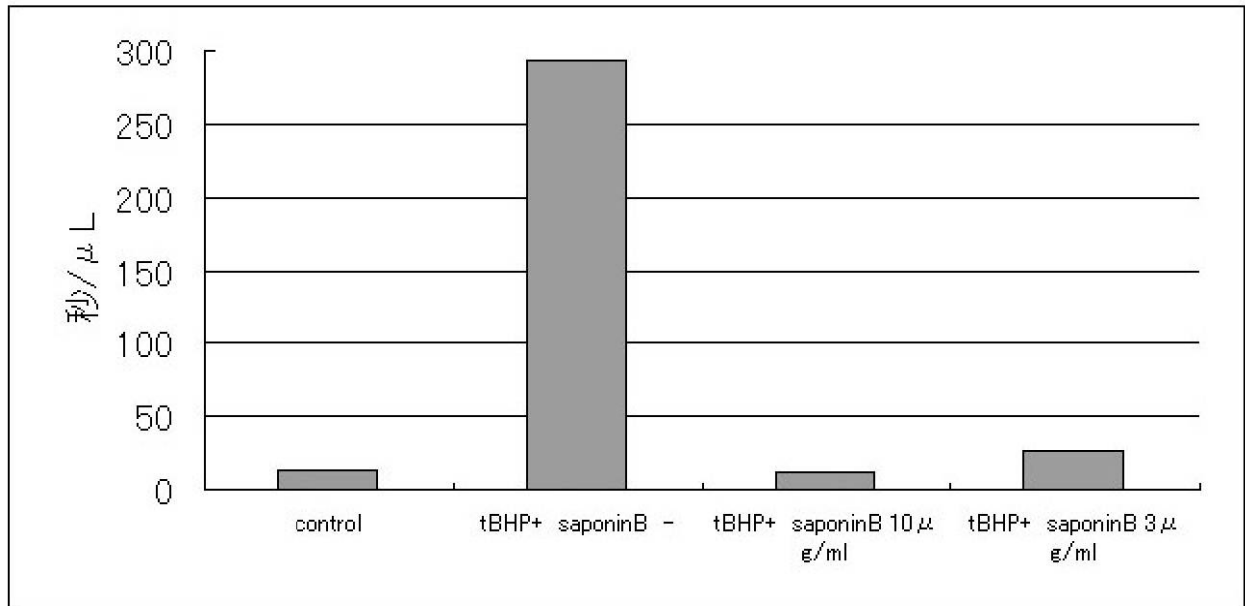
【図 1】



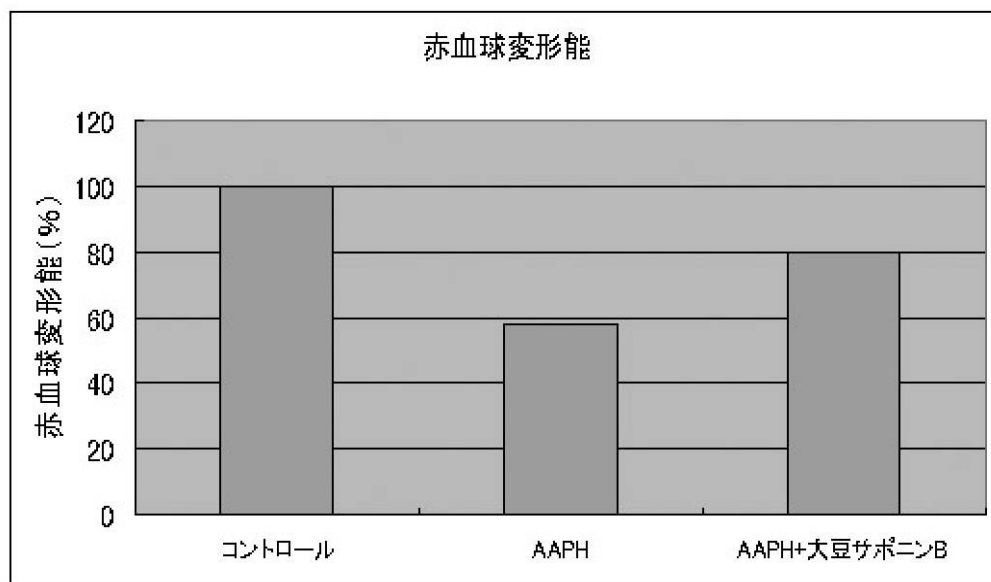
【図 2】



【図 3】



【図 4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
A 2 3 K 1/14 (2006.01) A 2 3 K 1/14

(72)発明者 三原 千延

神奈川県横浜市戸塚区上品濃 1 2 番 1 3 号 株式会社ファンケル総合研究所内

F ターム(参考) 2B150 AA01 AB10 CE08 DC14
4B018 MD07 MD58 ME14 MF01
4C086 AA01 AA02 AA04 EA10 MA01 MA04 MA52 NA14 ZA36
4C088 AB61 AC04 BA09 BA10 CA05 CA06 MA52 NA14 ZA36